

DOCKET NO.: 263364US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hisao KURODA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/07887

INTERNATIONAL FILING DATE: June 20, 2003

FOR: METHOD FOR SCREENING MALT AND METHOD FOR PRODUCING MALT-BASED SPARKLING BEVERAGE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	2002-180315	20 June 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/07887. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

10/517311

DT05 17th PCT/PTO 17 DEC 2004

DOCKET NO.: 263364US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hisao KURODA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/07887

INTERNATIONAL FILING DATE: June 20, 2003

FOR: METHOD FOR SCREENING MALT AND METHOD FOR PRODUCING MALT-BASED SPARKLING BEVERAGE

**REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Commissioner for Patents

Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

Rec'd PCT/CN 17 DEC 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

20.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 6月20日

REC'D 08 AUG 2003

出願番号
Application Number: 特願2002-180315
[ST. 10/C]: [JP2002-180315]

WFO PCT

出願人
Applicant(s): サッポロビール株式会社

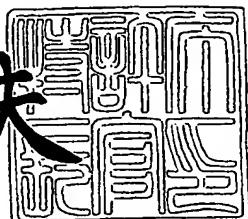
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 7月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 510-1348
【提出日】 平成14年 6月20日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12C 1/00
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 醸造技術研究所内
【氏名】 黒田 久夫
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 醸造技術研究所内
【氏名】 古庄 重樹
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県焼津市岡当目10 サッポロビール株式会社 醸造技術研究所内
【氏名】 小島 英敏
【特許出願人】
【識別番号】 000002196
【氏名又は名称】 サッポロビール株式会社
【代理人】
【識別番号】 100088155
【弁理士】
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【選任した代理人】
【識別番号】 100089978
【弁理士】
【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 麦芽のスクリーニング方法及び麦芽発泡飲料の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする麦芽のスクリーニング方法。

【請求項2】 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項3】 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されることによる前記脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価することを特徴とする、請求項1に記載のスクリーニング方法。

【請求項4】 請求項1～3のうちのいずれか一項に記載のスクリーニング方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を用いることを特徴とする、麦芽発泡飲料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、麦芽のスクリーニング方法、並びにそれによりスクリーニングされた麦芽を用いた麦芽発泡飲料の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ビール、発泡酒などの麦芽発泡飲料の原料として利用される麦芽には、多量の脂質や脂肪酸が含まれる。これら脂質や脂肪酸は、麦芽発泡飲料の製造工程における仕込工程において、酵素リポキシゲナーゼまたは自動酸化により酸化され、脂質ヒドロペルオキシドや脂肪酸ヒドロペルオキシドを生ずることが知られている (Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., and Koshino, S., J. Ferment. Bi oeng., 76, 371-375, 1993)。このような脂質ヒドロペルオキシドは、麦芽に

含まれるリバーゼにより加水分解を受け、脂肪酸ヒドロペルオキシドを生成することが知られている。この脂肪酸ヒドロペルオキシドは、熱分解や化学的分解により、老化臭、青臭み、脂肪酸臭などを有するアルデヒド類などの分解生成物を生成し、製品（麦芽発泡飲料）の香味を著しく損なう要因となることが知られている（Drost, B. W., van Eerde, P., Hoekstra, S. F., and Strating, J., Proc. of the 13th Congress, Estoril, Portugal, 1971）。

【0003】

従来は、このような分解生成物の生成を抑える技術として、麦芽発泡飲料の製造工程において仕込温度を上げてリポキシゲナーゼ活性を抑制する方法、リポキシゲナーゼ活性の低い麦芽を用いる方法などが提案されてきた（Drost, B. W., van den Berg, R., Freijee, F. J.M., van der Velde, E. G., and Hollemans, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990）。

【0004】

しかしながら、このような仕込温度を上げる方法では、蛋白質分解酵素や糖化酵素の作用も抑制され、発酵に必要な栄養源が不足し香味品質が損なわれるという問題があり、このような方法による老化臭の制御には限界があった。また、リポキシゲナーゼ活性の低い麦芽を用いる方法として、麦芽を高温で処理しリポキシゲナーゼを失活させる方法もあるが、香味バランスが崩れたり、香味品質に悪影響を与えるという問題があり、充分な方法ではなかった。さらに、麦芽には既に脂質ヒドロペルオキシドが存在することが分かっている。この脂質ヒドロペルオキシドは、もろみ中のリバーゼにより脂肪酸ヒドロペルオキシドに加水分解され、リポキシゲナーゼが関与することなく、分解生成物が生成することから、リポキシゲナーゼ単独の抑制による香味品質の改善には限界があった（Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., and Koshino, S., J. Am. Soc. Brew. Chem., 52(4): 141-5, 1994）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、老化臭が低減された麦芽発泡飲料を製造するために有用な麦芽のスクリーニング方法（原

料選抜方法)を提供し、さらに係る方法によりスクリーニングされた麦芽を用いた麦芽発泡飲料の製造方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく銳意研究を重ねた結果、脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解生成物(アルデヒド類など)に分解される過程においても酵素が関与することを初めて見出した。すなわち、本発明者らは、麦芽発泡飲料の製造工程において、もろみを製造する時に脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解・開裂し、分解生成物を生成することを見出した。また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼは高い熱安定性を示し、従来の仕込温度を上げる方法ではこの酵素の働きを抑制することは困難であることを確認した。その結果、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性の低い麦芽をスクリーニングし、原料として利用することにより、分解生成物(老化物質)の生成が抑制され、より香味品質の良い麦芽発泡飲料を製造することが可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明の麦芽のスクリーニング方法は、麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を測定することを特徴とする方法である。

【0008】

前記本発明のスクリーニング方法においては、(i) 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を評価してもよく、また、(ii) 脂肪酸ヒドロペルオキシドが前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼにより分解されることによる前記脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定することにより、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を評価してもよい。

【0009】

また、本発明の麦芽発泡飲料の製造方法は、前記本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性の低い

麦芽を用いることを特徴とする方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0011】

(麦芽のスクリーニング方法)

本発明の麦芽のスクリーニング方法は、麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を評価する方法である。本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼとは、脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解せしめる酵素である。ここで、脂肪酸ヒドロペルオキシドとは、麦芽中の脂質または脂肪酸から生成するものであり、例えば、リノール酸ヒドロペルオキシド（9-リノール酸ヒドロペルオキシド（9-HPOD）、13-リノール酸ヒドロペルオキシド（13-HPOD））、9-リノレン酸ヒドロペルオキシド、13-リノレン酸ヒドロペルオキシドが挙げられる。また、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドは、Larodan Fine Chemicals, Malmo, Swedenなどから入手することも可能である。

【0012】

麦芽発泡飲料の製造工程において、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解に関与することは、本発明の過程で本発明者らが初めて見出したものである。

【0013】

本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、以下の (i) または (ii) の方法により好適に評価することができる。 (i) 麦芽抽出液に脂肪酸ヒドロペルオキシドを加える等して麦芽抽出液中の脂肪酸ヒドロペルオキシドの量を所定値とした後に、所定条件下（例えば、25℃で15分間）インキュベートし、脂肪酸ヒドロペルオキシドが脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されて生成した分解生成物の生成量を測定し評価する方法。 (ii) 麦芽抽出液に脂肪酸ヒドロペルオキシドを加える等して麦芽抽出液中の脂肪酸ヒドロペルオキシドの量を所定値とした後に、所定条件下インキュベートし、脂肪酸ヒドロペルオキシドが脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼにより分解されることによる脂肪

酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定し評価する方法。このような麦芽抽出液は、所定量の粉碎麦芽を所定量の緩衝液（例えば、酢酸緩衝液）に加え、所定時間攪拌することにより得ることができる。また、このような分解生成物としては、脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解されて生成したアルデヒド類が挙げられ、具体的には、ノネナール（トランス-2-ノネナール）、ヘキサナール、ヘキセナール、ノネンジエナールなどが挙げられる。

【0014】

このような分解生成物の生成量を測定する方法としては、特に制限されず、公知の方法により測定されるが、例えば、各種誘導体化試薬で分解生成物を誘導体化し高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定する方法、分解生成物をガスクロマトグラフィーで測定する方法が使用できる。また、このような脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を測定する方法としては、特に制限されず、公知の方法により測定されるが、例えば、基質である脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法が使用できる。

【0015】

脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性は、このような分解生成物の生成量が少ないと生成速度が遅いほど、或いは脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量が少ないと減少速度が遅いほど、活性が低いと評価できる。また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性は、上記方法により測定された測定値から、以下の式により算出することにより評価することもできる。

(i) 分解生成物（アルデヒド類）の生成量を測定する方法では、以下の計算式によって脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性（酵素活性）を算出する。

酵素活性 ($m\text{U/g}$) = 1分間における分解生成物の生成量 (μM) × 反応液全量 (mL) ÷ 酵素液量 (mL) ÷ 酵素液濃度 (g/mL)

(ii) 脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法では、以下の計算式によって酵素活性を算出する。

酵素活性 (nmol/g) = 1分間における 234nm の紫外吸光度減少 × 0.667 × 反応液全量 (mL) ÷ 酵素液量 (mL) ÷ 酵素液濃度 (g/mL)。

【0016】

このような活性の測定から、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を評価することが可能となり、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性のより低く、具体的には、酵素活性が 2 mU/g 以下、より好ましくは 0.1 mU/g 以下、または 5 nkat/g 以下、より好ましくは 1 nkat/g 以下である麦芽を好適にスクリーニングすることが可能となる。なお、上記方法による検出限界は、分解生成物（アルデヒド類）の生成量を測定する方法では 0.1 mU/g であり、脂肪酸ヒドロペルオキシドの減少量を紫外吸光で測定する方法では 1 nkat/g である。

【0017】

また、本発明に係る脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を測定することにより、麦汁ノネナールポテンシャルとの相関により、製品老化を予測することが可能となる。ここで、製品老化とは、製品の容器充填後の保存に伴う、品質の劣化をいう。麦汁ノネナールポテンシャルとは、製品老化を予測できる指標であり、コングレス法 (European Brewery Convention. Analytica-EBC (5th ed.), 1998) により麦汁を作製し、Drost らの方法 (Drost, B. W., van den Berg, R., Freijee, F. J.M., van der Velde, E. G., and Hollemans, M., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124-131, 1990) で測定することにより得られる指標である。麦汁ノネナールポテンシャルが 10 ppb 以下、より好ましくは 1 ppb 以下の麦芽は、老化耐久性の優れた麦芽発泡飲料を製造するための原料として好ましい。

(麦芽発泡飲料の製造方法)

本発明の麦芽発泡飲料の製造方法においては、本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽が原料として用いられる。

【0018】

このような本発明の製造方法は、通常の製造工程、すなわち、糖化工程、麦汁煮沸工程、冷却工程、発酵工程、熟成工程を含んでいればよく、その具体的な工程は特に制限されず、一般的な条件が採用される。

【0019】

糖化工程は、麦芽を含む原料を糖化させることにより糖化液を得る工程である。本発明で用いられる麦芽は、本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽であり、具体的には、酵素活性が2mU/g以下、より好ましくは0.1mU/g以下、または5nkat/g以下、より好ましくは1nkat/g以下である麦芽が好ましい。また、このような麦芽は大麦に水分と空気とを十分に与えて発芽させ、乾燥して幼芽を取り除いたものであることが好ましい。麦芽は麦汁製造に必要な酵素源であると同時に糖化の原料として主要な澱粉源となる。また、麦芽を焙焼することにより、麦芽発泡飲料特有の香味と色素とを付与することができる。例えば、大麦を浸麦度40~45%まで浸麦した後、10~20℃で3~6日間発芽させ、これを焙煎することによって目的の麦芽を得ることができる。

【0020】

麦芽を含む原料を糖化する方法は、特に制限されないが、例えば、麦芽を含む原料と仕込み用水とを仕込み釜に入れて混合し、その混合物を所定の温度（好ましくは65~75℃）に加温した後、必要に応じて濾過により滓を除去して糖化液を得ることができる。原料中の麦芽の使用比率は、ビール、発泡酒等の麦芽発泡飲料の種類に応じて適宜選定される。また、このとき、市販又は別途調製されたモルトエキスを仕込み用水と混合してもよく、必要に応じてコーンスターク、コーングリッツ、米、糖類などの副原料を添加してもよい。

【0021】

麦汁煮沸工程は、糖化液を濾過して得られる麦汁にホップを添加し、その混合物を煮沸する工程である。これにより、麦芽発泡飲料特有の香りと苦味とが付与され、また、麦芽の酵素の働きが止められる。糖化液におけるホップの含有量は好ましくは0.5~3.0g/Lの範囲内であり、また、当該混合物の煮沸時間は好ましくは90~120分間である。

【0022】

麦汁煮沸工程後の麦汁（熱麦汁）は、所定の温度まで冷却された後、後述する発酵工程に供される。この冷却工程においては、熱麦汁を通常15℃以下まで冷却する。

【0023】

発酵工程では、冷却工程後の麦汁に酵母を添加して、麦汁を発酵させることにより発酵液が得られる。発酵工程で用いられる酵母は、麦汁内の糖分を代謝してアルコールや炭酸ガス等を産生するもの（いわゆるアルコール発酵を行う酒類酵母）であれば特に制限されず、具体的には、サッカロミセス・セレビシエ、サッカロミセス・ウバルム等が挙げられる。

【0024】

また、発酵条件については特に制限されないが、発酵温度は好ましくは15℃以下、より好ましくは8～10℃であり、発酵時間は好ましくは8～10日である。このようにして得られる発酵液を熟成した後、これを濾過することによって、麦芽発泡飲料が得られる。

【0025】

熟成工程における条件は特に制限されないが、例えば密閉タンク等に貯蔵して貯蔵温度-5～3℃で30～90日間貯蔵することにより残存エキスの再発酵と熟成とを好適に行うことができる。

【0026】

また、濾過条件についても特に制限されないが、濾過助剤として珪藻土、P V P P（ポリビニルポリピロリドン）、シリカゲル、セルロースパウダー等を用いて濾過を行う。濾過された麦芽発泡飲料はタンク詰め、たる詰め、瓶詰め、缶詰め等されて市場に出荷される。

【0027】

本発明の方法で製造可能な麦芽発泡飲料としては、例えば、ビール、発泡酒が挙げられる。また、本発明の製造方法により製造された麦芽発泡飲料は、麦芽由来の脂肪酸ヒドロペルオキシドが分解されることにより生成するアルデヒド類等の老化物質の含有量が少なく、老化耐久性に優れている。

【0028】**【実施例】**

以下、実施例により本発明の内容をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。まず、脂肪酸ヒドロペルオキシドリア

ーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解生成物に分解することを証明するために、以下の試験を行った。

【0029】

(証明試験1)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解する酵素であり、もろみで働くことの証明

図1に示すように、4つの実験区1～4を設定し、以下の3段階の処理を行った。(1) 麦芽中のリポキシゲナーゼ(LOX)失活処理として、それぞれ70℃に保温された仕込水10mlに粉碎麦芽3.5gを加え、攪拌しながら70℃30分間インキュベートした。粉碎麦芽3.5gにはLOXが1.6ユニット含有されるが、この処理で麦芽中のLOXは失活する。(2) 麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼに対する処理として、実験区1と2は氷浴に静置し脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性を残存せしめ、実験区3と4は10分間煮沸することにより脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼを失活させた。(3) 脂肪酸ヒドロペルオキシドリニアーゼ活性を測定する前処理として、実験区1と3には組換えオオムギリポキシゲナーゼ(以下「組み換えLOX-1」という)を、実験区2と4には熱失活した組換えオオムギリポキシゲナーゼ(以下「熱変性組み換えLOX-1」という)を添加した(それぞれ1.6ユニット)。組み換えLOX-1及び熱変性組み換えLOX-1は、それぞれ黒田の方法等により準備した(Kuroda, H., Kobayashi, N., Kaneda, H., Watari, J., Takashio, M., J. Biosci. Bioeng., 93: , 2002)。その後、すべての実験区を50℃20分間インキュベートし、遠心分離によって上清を回収した(15,000×g、10分間)。

【0030】

以上3段階の処理の後、SPME-GC-MS (Hewlett Packerd HP6890/MSD system)により、分解生成物濃度を測定した結果、次の事が分かった。なお、本試験では、分解生成物としてトランス-2-ノネナールを測定し、測定結果はnMを単位として示した。また、トランス-2-ノネナールは、9-リノール酸ヒドロペルオキシドが分解することにより生成することから、本試験においては

脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼの中の、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼの活性を測定している。

【0031】

図2に示すように、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが活性で、組み換えL O X-1を添加した実験区1では、トランス-2-ノネナール濃度は著しく大きく増加した。一方、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが活性で、熱変性組み換えL O X-1を添加した実験区2では、トランス-2-ノネナール濃度はほとんど増加しなかった。脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが失活した実験区3と4では、組換え又は熱変性組換えL O X-1の添加によるトランス-2-ノネナール濃度増加は僅かであった。この結果は、70℃30分間のインキュベートでは失活せず、煮沸すると失活するトランス-2-ノネナールの生成を促進する因子が存在することを示している。この因子は、L O Xが麦芽由来のリノール酸を酸化することによって生成する9-リノール酸ヒドロペルオキシドを開裂する酵素、すなわち9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼ（脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ）である。

【0032】

さらに、前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが麦芽発泡飲料の製造工程において耐熱性を有し、酵素として働いていることを証明するために、以下の試験を行った。

【0033】

(証明試験2)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼが脂肪酸ヒドロペルオキシドを分解する酵素であり、耐熱性を有することの証明

仕込工程における脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼの働きを解析するために、実験室レベルのコングレス糖化試験を実施し、経時的にマイシエを分離した。マイシエサンプルを遠心分離し（3,000×g、15分間）、上清または沈殿に分け、沈殿はさらに0.15%のT r i t o n Xを含む酢酸緩衝液（0.1M、p H 6.0）を用いて抽出した。なお、本試験では、脂肪酸ヒドロペルオキシドとしてリノール酸ヒドロペルオキシド（9-HPODまたは13-HPOD

) を測定した。リノール酸ヒドロペルオキシドの減少速度は以下のように測定した。

【0034】

キュベットに $500 \mu\text{l}$ の酢酸緩衝液 (0.1M, pH 6.0) と終濃度 $40 \mu\text{M}$ の 9-H POD または 13-H POD を加え、次に $5 \mu\text{l}$ の酵素液 (分離した上清または沈殿の抽出液) を添加、混合し 9-H POD 及び 13-H POD の共役ジエン構造の吸収波長 234 nm を追跡して、リノール酸ヒドロペルオキシドの減少速度を測定した。その測定結果から酵素活性 (分解活性 (nkat/g 沈殿)) を以下の計算式を用いて求め、図 3 に示した。なお、測定機器は日立分光光度計 U-3500 を用いた。

酵素活性 (nkat/g) = 1 分間における 234 nm の紫外吸光度減少 $\times 0.667 \times$ 反応液全量 (mL) \div 酵素液量 (mL) \div 酵素液濃度 (g/mL)。

【0035】

マイシェ上清からは分解活性が全く検出されなかつたが、沈殿を界面活性剤で可溶化した抽出液からは分解活性が検出された。仕込初期の分解活性は、13-H POD (Δ) 分解活性が 9-H POD (\bigcirc) 分解活性に比べ、約 2 倍の分解活性を示した。また、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼ及び 13-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼは、 70°C で 30 分経過しても分解活性を示すことから、リポキシゲナーゼよりも高い耐熱性を有しているといえる。また、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼ及び 13-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼは、それぞれ耐熱性が異なり、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼの方が高い耐熱性を示し、糖化終了後においても最大 (仕込初期) の約 1 割ほどが残存することが分かった。また、9-H POD 分解活性と 13-H POD 分解活性が異なることからリノール酸ヒドロペルオキシドリーゼには基質特異性の異なる 2 つのアイソザイムが存在することが明らかとなり、それぞれのアイソザイムがそれぞれノネナール (トランス-2-ノネナール) とヘキサナールを生成する。

【0036】

証明試験 1、2 より、脂肪酸ヒドロペルオキシド (9-リノール酸ヒドロペル

オキシド）から分解生成物（トランス-2-ノネナール）が生成する因子は、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ（9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ）であることが証明された。次に、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼの製品（麦芽発泡飲料）への影響を調べるために、以下の試験を行った。

【0037】

（証明試験3）

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼがもろみで働いた場合、発酵後の製品の老化物質が増加することの証明

4つの実験区1～4を設定し、粉碎麦芽、仕込水、LOXの量を変えた以外は、処理（1）～（3）に関しては証明試験1と同様に行った。（1）それぞれ70℃に保温された仕込水50mlに粉碎麦芽17.5gを加え、攪拌しながら70℃30分間インキュベートした。次に実験区1と2は氷浴に静置し、実験区3と4は10分間煮沸した。（2）実験区1と2は氷浴に静置し脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性を残存せしめ、実験区3と4は10分間煮沸することにより脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを失活させた。（3）次に実験区1と3に組み換えLOX-1を、実験区2と4には熱変性組み換えLOX-1を添加した（7.9ユニット）。組み換えLOX-1及び熱変性組み換えLOX-1は、証明試験1と同様に準備した。その後、すべての実験区（サンプル）を50℃20分間インキュベートし、ろ紙を用いてろ過した。

【0038】

さらに残渣を50℃に保温した50mlの蒸留水で洗った。これにホップエキス0.2gを添加し、100℃で90分間煮沸後、下面酵母1.2gを添加し12℃で11日間発酵させた。発酵液上澄みを12℃1週間、さらに4℃2週間熟成し、これをメンブランフィルター濾過し、証明試験1と同様にトランス-2-ノネナールを測定した（図4）。その結果、証明試験1で見られたトランス-2-ノネナール濃度の差異がビールにおいても観察され、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ（9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ）が仕込工程等において働き、その結果生成した分解生成物（トランス-2-ノネナール）が製品に残存することが証明された。

【0039】

また、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを失活させた実験区3では、トランヌー2-ノネナールの製品における残存量が少ないとから、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を麦芽発泡飲料の製造に用いることが、老化臭の低減された製品を製造するために有用であることが確認された。以下、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定方法について、実施例をもとに説明する。

【0040】

(実施例1)

HPLCによる脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

麦芽1gをコーヒーミルで粉碎し、10mLの0.15%Tween20を含む酢酸緩衝液(0.1M、pH5.5)を加えて一時間攪拌した。次に、4℃、15,000gの条件で遠心し、上清を分離した。上清1mLに対し、終濃度100μMの9-HPODまたは13-HPODを加え、25℃の条件で15分間インキュベートした後、1mLの0.1%2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと0.5M酢酸を含むエタノール溶液を加え混合し、反応停止と誘導体化を行った。この溶液を3時間室温で放置した後、ヘキサンで抽出した。生成した分解生成物であるノネナールは、高速液体クロマトグラフィー(C-R7A/LV-10A HPLC system)でZorbax ODSカラムを用いて分離・定量した。溶離液はアセトニトリル：水：酢酸(600:400:1)を用いた。分解生成物(ノネナール)の生成量の測定後、以下の計算式によって酵素活性を算出した。

$$\text{酵素活性 (mU/g)} = \frac{\text{1分間における分解生成物の生成量} (\mu\text{M}) \times \text{反応液全量} (\text{mL})}{\text{酵素液量} (\text{mL}) \div \text{酵素液濃度} (\text{g/mL})}$$

上記の方法により麦芽20点に対して、9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、概ね2~6mU/gの範囲にあることがわかった。

【0041】

(実施例2)

ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

実施例1と同様に麦芽抽出液を用意した。抽出液1 mLをガスクロマトグラフイー用バイアルに分注し、氷冷した。終濃度100 μMの9-H PODまたは13-H PODを加え、25℃の条件で10分間インキュベートした後、スペルコ製ポリジメチルシロキサンSPMEファイバーを挿入し、さらに5分間インキュベートし、ガスクロマトグラフイー (Hewlett Packerd HP6890/MSD system) に供試した。キャピラリーカラムはJ & W社製DB-1 (30m×0.25mm, フィルム厚1 μm) を用い、キャリアガスとしてヘリウム (1 mL/分) を用い、オーブン条件は60℃から225℃ (5℃/分) 、セレクトイオンモード (m/z: 70, 72) の条件でヘキサナールまたはノネナールを定量した。分解生成物 (アルデヒド類) の生成量の測定後、以下の計算式によって酵素活性を算出した。

$$\text{酵素活性 (mU/g)} = \frac{\text{1分間における分解生成物の生成量 (\mu M)}}{\text{反応液全量 (mL)}} \times \frac{1}{\text{酵素液量 (mL)}} \times \frac{1}{\text{酵素液濃度 (g/mL)}}$$

上記の方法により麦芽20点に対して9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性は、概ね2~6 mU/gの範囲にあることがわかった。

【0042】

(実施例3)

基質減少量測定による脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定

実施例1と同様に麦芽抽出液を用意した。キュベットに500 μlの酢酸緩衝液 (0.1M, pH 6.0) と終濃度40 μMの9-H PODまたは13-H PODを加え、次に5 μlの酵素液を添加、混合しリノール酸ヒドロペルオキシドの共役ジエン構造の吸収波長234 nmを追跡した。測定は、証明試験2と同様の方法で行った。リノール酸ヒドロペルオキシドの減少速度から酵素活性を以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{酵素活性 (nkat/g)} = \frac{\text{1分間における234 nmの紫外吸光度減少} \times 0.667}{\text{反応液全量 (mL)}} \times \frac{1}{\text{酵素液量 (mL)}} \times \frac{1}{\text{酵素液濃度 (g/mL)}}$$

上記の方法により麦芽20点に対して9-リノール酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の測定を行った。その結果、各麦芽の9-リノール酸ヒドロペルオキシド

リアーゼ活性は、概ね 5~20 nkat/g の範囲にあることがわかった。

【0043】

(実施例4)

脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼと老化指標との相関

麦芽20点を用意し、コングレス法により麦汁を作製した。麦汁ノネナールポテンシャルをDrostらの方法で測定し、麦芽の脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを実施例2の方法で測定した。両者をプロットすると、図5に示すように正の相関が見出された ($r = 0.53$)。ノネナールポテンシャルは製品老化を予測できる指標であり、ノネナールポテンシャルが10ppb以下、より好ましくは1ppb以下の麦芽は、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性が低く好ましい。よって、脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼを測定すれば、麦汁ノネナールポテンシャルとの相関関係により製品老化を予測する事が可能となる。

【0044】

【発明の効果】

本発明のスクリーニング方法を利用することにより、老化臭が低減された麦芽発泡飲料を製造するために有用な、すなわち脂肪酸ヒドロペルオキシドの分解によるアルデヒド類等の老化物質の生成が抑制される麦芽をスクリーニングすることが可能となる。そして、本発明のスクリーニング方法でスクリーニングされた脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ活性の低い麦芽を利用することにより、仕込み工程中等における老化物質である分解生成物の生成を抑制し、老化耐久性に優れた麦芽発泡飲料を製造することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

証明試験1においてSPME-GC-MS解析するにあたって、実験区1~4にそれぞれ施した処理の概略を示す流れ図である。

【図2】

証明試験1において得られた、実験区1~4における分解生成物（トランヌー2-ノネナール）の生成量を示すグラフである。

【図3】

証明試験2において脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を経時的に測定して得られた、脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性とマイシエ温度との経時的变化を示すグラフである。

【図4】

証明試験3において得られた、実験区1～4における分解生成物（トランス-2-ノネナール）の生成量を示すグラフである。

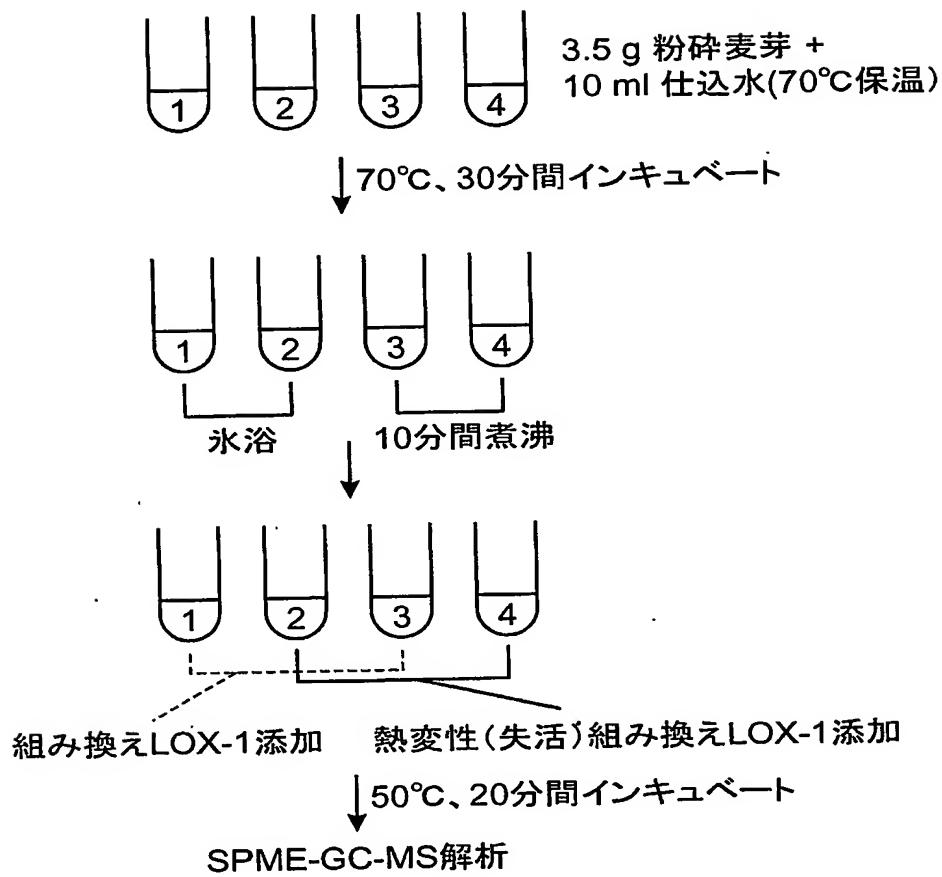
【図5】

実施例4において得られた、ノネナールポテンシャルと9-リノール酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性との相関関係を示すグラフである。

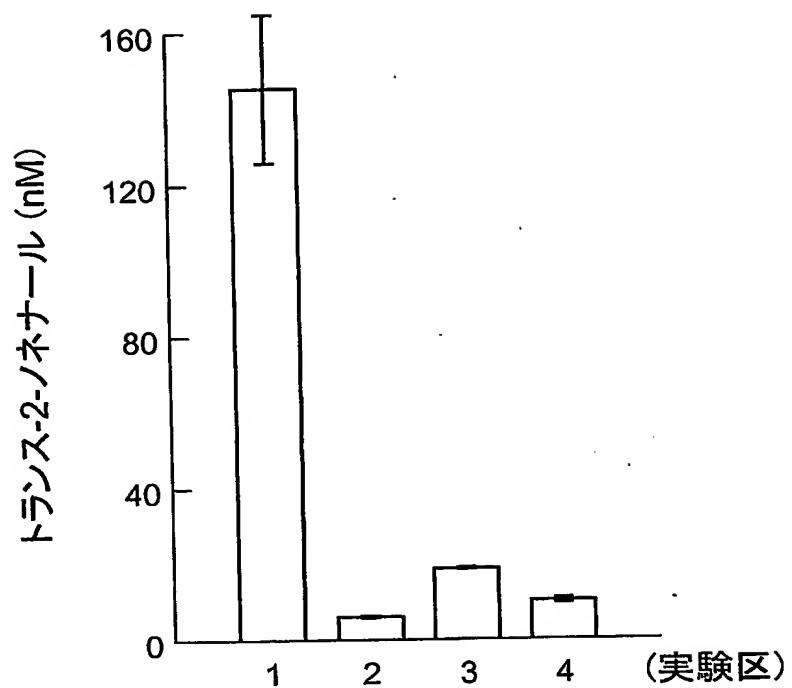
【書類名】

図面

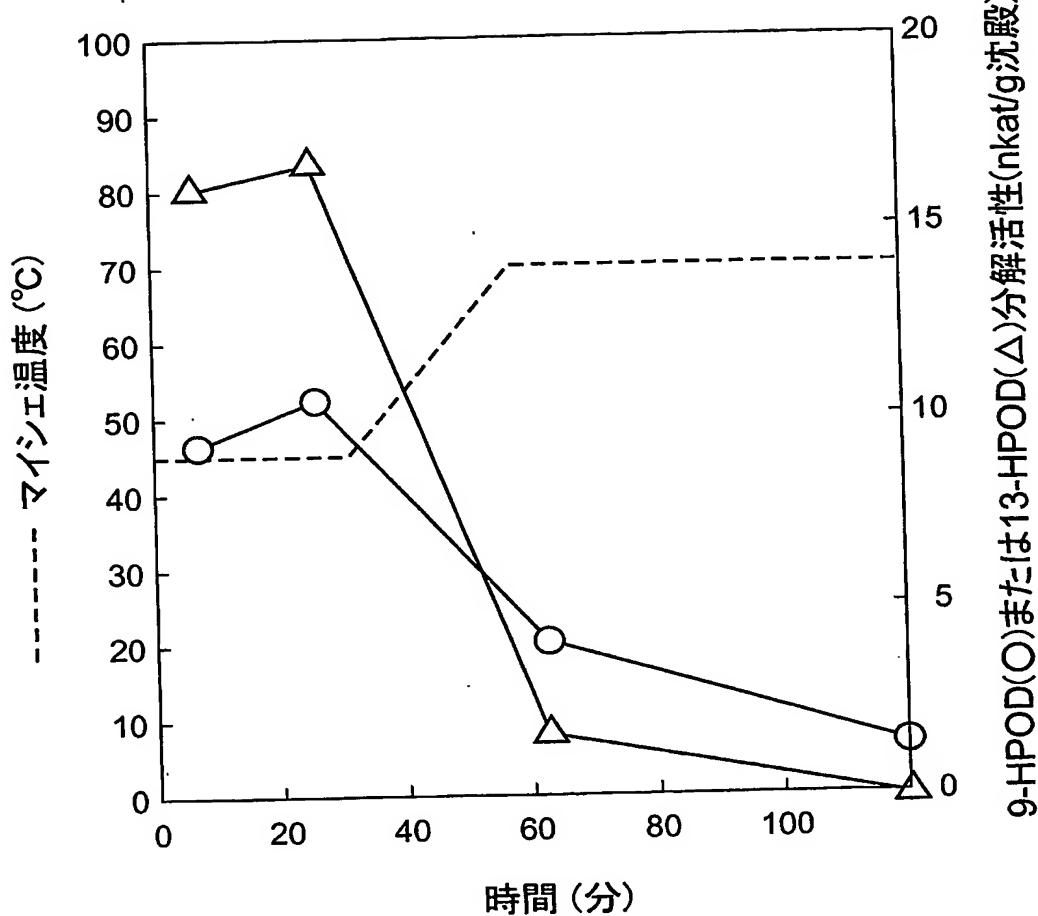
【図1】



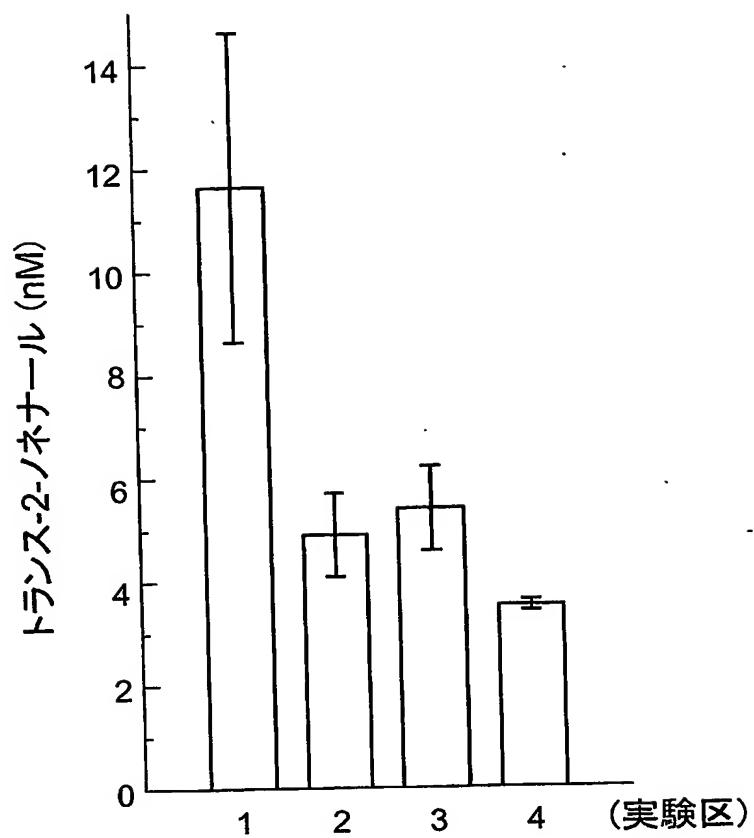
【図2】



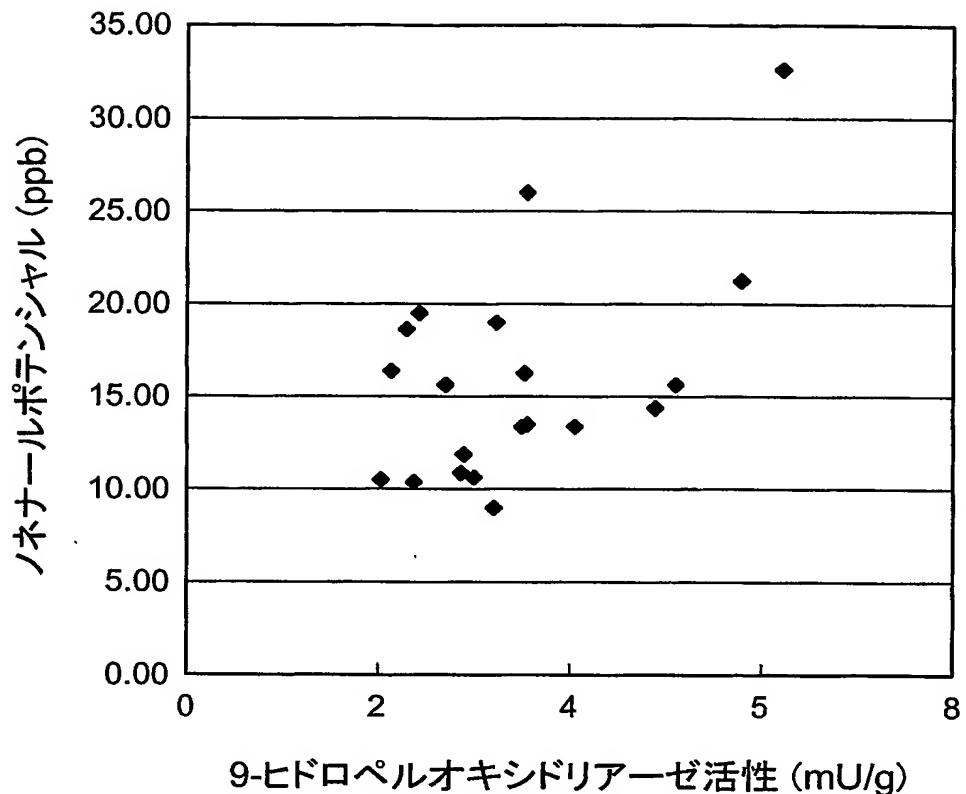
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 老化臭が低減された麦芽発泡飲料を製造するために有用な麦芽のスクリーニング方法を提供し、さらに係る方法によりスクリーニングされた麦芽を用いた麦芽発泡飲料の製造方法を提供すること。

【解決手段】 麦芽中の脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性を測定することを特徴とする麦芽のスクリーニング方法、並びにその方法によりスクリーニングされた前記脂肪酸ヒドロペルオキシドリーゼ活性の低い麦芽を用いることを特徴とする、麦芽発泡飲料の製造方法。

【選択図】 なし

出願 2002-180315

出願人履歴情報

識別番号

[000002196]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1990年 8月 8日

新規登録

東京都中央区銀座7丁目10番1号

サッポロビール株式会社

2. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1994年12月22日

住所変更

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番1号

サッポロビール株式会社